

文章编号: 1000-0615(2001)05-0460-04

鳊鱼病毒传播途径的初步研究

吴淑勤, 李新辉, 石存斌, 赖子尼, 潘厚军, 李凯彬

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要:采用 PCR 方法, 追踪养殖鳊的亲鱼、子代、饵料鱼及与鳊养殖环境相关的水体生物和非生物因子中鳊鱼病毒的存在状况, 并探讨鳊鱼病毒的传播途径。本研究中, 鳊鱼塘水体中采集的除鳊以外的其他生物、底泥及水样的核酸抽提样本 PCR 扩增病毒结果呈阴性; 感染病毒的亲鱼, 其性腺中可检测出病毒, 其子代组织病毒检测亦呈阳性。研究获得病毒可以在鳊体内呈潜伏状态存在和病毒可以垂直传播的一些证据。

关键词:鳊鱼病毒; 聚合酶链式反应; 传播途径

中图分类号: S941.41; S943 文献标识码: A

Preliminary study on the transmission route of *Spercara chuatsi* virus

WU Shu-qin, LI Xin-hui, SHI Cun-bin, LAI Zi-ni, PAN Hou-jun, LI Kai-bin

(Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to discuss the transmission of *Spercara chuatsi* virus (SCV), the existence of SCV was checked in the tissues of parent fish, their offspring, feedstuff fish, and in some factors relating to rearing environment of mandarin fish *Spercara chuatsi* by means of polymerase chain reaction (PCR). The SCV positive results were demonstrated in the parents' gonad and their offspring, while the SCV negative results were shown in all other samples collected in this experiment, including the diseased pond's environmental factors such as plankton, upper-layer silt, and some aquatic insects. Some evidences were acquired in this investigation that SCV can exist in *Spercara chuatsi* in a latent state and can transmit from parent to its offspring.

Key words: *Spercara chuatsi* virus (SCV); polymerase chain reaction; transmission route

1994 年以来, 广东省鳊 (*Siniperca chuatsi*) 养殖主产区, 每年在 5-10 月份大规模暴发一种流行性疾病, 致使养殖鳊大量死亡, 造成严重的经济损失。吴淑勤等^[1]、李新辉等^[2]用病原排除法, 结合流行病学调查、分子生物学检测外源核酸的方法, 和通过电镜观察对病原进行研究。在患病鳊的脾脏、肾脏和肝脏中检测到外源核酸, 并在病鱼的脾脏中观察到一种截面呈六角型、直径约 150nm 的病毒, 从而确定该病的主要病原为病毒, 并将该病毒定名为鳊鱼病毒 (*Siniperca chuatsi* virus, 简称 SCV)。随后, 何建国等^[3]、曾慷等^[4]、张奇亚和李正秋^[5]及方勤等^[6]也相继对病毒进行电镜观察分析、流行病症状分析以及离体病毒感染鱼和培养细胞的研究^[3-6]。李新辉等^[7]经分析得知, SCV 为双链 DNA 病毒, 并克隆、序列分析了 SCV 的部分基因, 进一步建立了 SCV 的聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法^[8]。在此基础上, 本研

收稿日期: 2000-12-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助 (980907); 广东省海洋与渔业局资助“池塘水生态与鳊鱼病害关系及调控技术的研究”

第一作者: 吴淑勤 (1956-), 女, 福建厦门人, 研究员, 学士, 主要从事鱼类病害研究。Tel: 020-81517825

究试图用 PCR 方法调查 SCV 的存在状态,并探讨病毒的传播途径。

1 材料和方法

1.1 试验样本来源

1.1.1 试验鱼

试验用鳊分别取自广东省南海市和新会市鳊鱼孵化场及成鱼养殖场。两个孵化场均与外界相对隔离,孵化用水是经过过滤消毒处理后备用的江河水。5月中下旬,分别在两个孵化场取刚行产卵(或排精)过的鳊亲鱼2对(南海市)和1对(新会市),并分别取性腺和脾脏等组织;在孵化场取这些亲鱼繁殖孵出的第七天的幼鱼2批次共12尾。6月上旬,在两个孵化场中取无症状子代(体长3cm)2批次共12尾。8月下旬,在患典型暴发病症状池塘,取6尾患病子代的脾脏及其他内脏。对照用健康鳊6尾,接近性成熟,取自非疫区的湖南省汨罗江段的野生鱼。

1.1.2 饵料鱼

在患典型暴发病症状的鳊鱼塘中,取3尾作为饵料鱼的鳊。

1.1.3 发病塘其它样本

在有典型暴发病症状鳊鱼塘,用捞网捞取水生昆虫,分类后每种取3只,分别作为抽提核酸的样本;用80目滤网在鱼塘水体中捞取浮游动植物混合物0.5g,作为抽提核酸的样本;取用80目滤网过滤鱼塘水200mL,滤液离心,沉淀物作为抽提核酸的样本;取上层底泥约10g,用生理盐水搅拌悬浮,低速离心后,上清作为提取核酸的样本。

1.2 引物与试剂

根据 SCV369^①二端序列设计引物 P1 5' - CGCGGATCCIGTAGTAAGTTGTTATTTG - 3' 和引物 P2 5' - ATAAGCTTAGCACCTTTGGCAACTAAGCCAC - 3', 由上海(Sangon)生物工程有限公司合成。

Taq DNA 聚合酶,四种三磷酸脱氧核苷混合物(dNTP)购自上海(Sangon)生物工程有限公司;DNA 酶(DNase)、RNA 酶(RNase)为华美生物工程公司产品;其它化学试剂为国产 AR 级产品。PCR 采用 PE2400 型核酸扩增仪。

1.3 样本核酸提取方法

1.3.1 试验鱼和饵料鱼核酸样本

鳊鱼亲鱼及其子代、鳊鱼及正常对照鳊鱼的核酸样本制备参照李新辉等^[2]的方法稍作修改。取鱼组织用灭菌生理盐水漂洗三次,清洗血污;卵巢样本剪开,取出卵粒用灭菌生理盐水漂洗三次,清洗血污。样品处理后,分别按 1:6(w/v)的比例加入 PE 缓冲液(0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液 + 0.02 mol·L⁻¹乙二胺四乙酸二钠(EDTA), pH 7.5)匀浆,2 000g 离心后,沉淀加入 1% 浓度的十二烷基硫酸钠(SDS)和蛋白酶 K(1 μg·mL⁻¹),65℃ 保温 30min,用酚、氯仿抽提获得总 DNA,作为检测用的核酸模板。

1.3.2 水生昆虫核酸样本

取水生昆虫,分别用灭菌生理盐水漂洗三次,清洗沾污物后,按 1:6(w/v)的比例加入 PE 缓冲液匀浆;2 000g 离心后,上清加入 1% 浓度的 SDS 和蛋白酶 K(1 μg·mL⁻¹),65℃ 保温 30 min,用酚、氯仿抽提获得总 DNA 作为检测用的核酸模板。

1.3.3 浮游生物核酸样本

取用 80 目网布过滤后浮游动植物的混合物,按 1:6(w/v)的比例分别加入 PE 缓冲液匀浆;2 000g 离心后,上清加入 1% 浓度的 SDS 和蛋白酶 K(1 μg·mL⁻¹),65℃ 保温 30 min,用酚、氯仿抽提;乙醇沉淀物用 30 μL TE(0.01 mol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷(Tris HCl) + 0.02 mol·L⁻¹乙二胺四乙酸二钠(EDTA), pH 7.5)溶解,作为检测用的核酸模板。

^①Li X H, Wu S Q, Li K B, et al. A RAPD Segment Sequence of *Siniperca chuatsi* virus. Gen Bank Acc: AZD14999.2000.

1.3.4 水样核酸试样

取用 80 目网布过滤后的池塘水 200mL, 用 100 000g 离心, 收集沉淀, 并加入 1% 浓度的 SDS 和蛋白酶 K ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 65°C 保温 30 min, 用酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀物用 $30 \mu\text{L}$ TE 缓冲液溶解, 获得检测用核酸模板。

1.3.5 底泥样本核酸试样

取上层底泥, 按 1:6(w/v) 的比例分别加入 PE 缓冲液, $1\ 000\text{g}$ 离心去沉淀, 上清液用 $100\ 000\text{g}$ 离心, 沉淀用 PE 缓冲液溶解, 用酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀物用 $30 \mu\text{L}$ TE 缓冲液溶解, 获得检测用核酸模板。

1.4 病毒 PCR 检测

提取的核酸样本分别用蒸馏水按 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶解, 作为模板备用。PCR 参照林万明等^[9]方法稍作修改, 模板 $0.5 \mu\text{L}$, 引物 $0.5 \mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 $1.5 \mu\text{L}$, 4dNTP 各 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应体积为 $50 \mu\text{L}$ 。反应条件为 95°C 预处理 5min; 后按 $94^\circ\text{C}30\text{s}$, $55^\circ\text{C}30\text{s}$, $72^\circ\text{C}1\text{min}$, 循环 25 次; 最后延伸 7min。循环结束后, PCR 产物经琼脂糖电泳、溴化乙锭染色, 在紫外灯下观察分析并拍照记录。

2 结果

以正常对照鳊组织和感染病毒鳊组织的核酸样本为模板, 用鳊鱼病毒特异性引物扩增, 相应结果如图 1。其中, E1 为用 SCV 为模板, SCVE369 扩增片段作为标准样。感染病毒鳊组织的核酸样本经扩增后可检出 SCVE369 片段, 而正常对照鳊组织 SCVE369 检测结果均为阴性。

以孵化场的鳊亲鱼的脾、肾和性腺以及其子代苗种组织的核酸样本的为模板, 用鳊鱼病毒 SCVE369 引物扩增, 相应结果如图 2。其中 D 为用 SCV 为模板, SCVE369 扩增片段作为 SCV 存在的标准。研究发现, 3 对亲鱼的性腺及其所有子代(孵出后第七天以及体长 3cm 的鱼苗)组织中 SCVE369 检测结果均呈阳性反应。

图 3 示以从发病鳊鱼塘水体中采集的部分生物和非生物因子的核酸样本为模板, 用鳊鱼病毒 SCVE369 引物扩增的结果。检测的 3 尾作为饵料鱼的鲢组织中均未发现 SCVE369 扩增产物存在; 在从病鱼塘中采集的水生昆虫、浮游动植物、池塘水和底泥中针对病毒的检测也均呈阴性反应(表 1)。

3 讨论

有关鳊暴发性传染病的报道已有不少, 曾慷等^[4]从病毒人工感染着手, 通过划痕浸泡和口服等途径可引起鳊患典型的发病症状, 并发现大口黑鲈能够感染上鳊鱼病毒, 说明病毒存在以食物传递、体表感染等方式进行水平传染的可能性。1994 年鳊

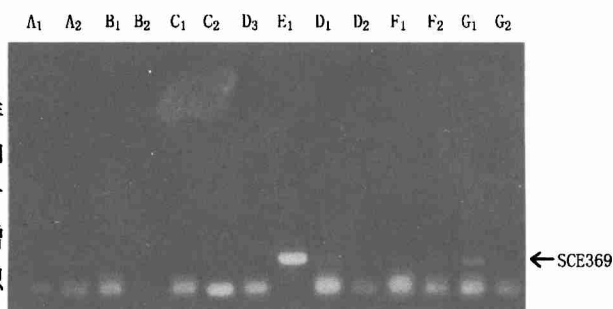


图 1 鳊组织核酸样本 PCR 检测结果

Fig. 1 Detection of SCV from different tissues of healthy and diseased mandarin fish using P1/P2 primer

注: A1, B1, C1: 健康鱼脾脏样本; A2, B2: 健康鱼精巢样本; C2 为健康鱼卵巢样本; D1, F1, G1 疫区鱼脾脏样本; F2, G2 为疫区鱼卵巢样本; D2 为疫区鱼精巢样本。D3 为血样; E1: 为 SCVE369 标准样。

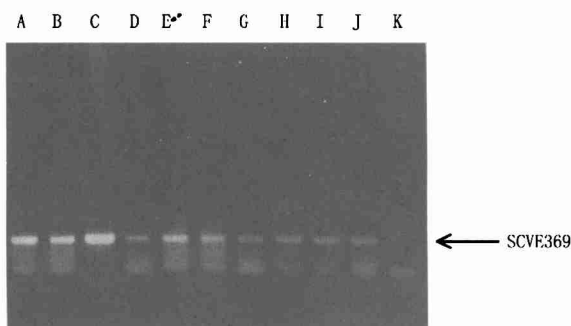


图 2 鳊鱼亲鱼及其子代组织核酸样本 PCR 检测结果

Fig. 2 Detection of SCV from different tissues of parent fish and their offspring using P1/P2 primer

注: A, B, D, E: 子代鳊鱼(7d)样本; C: SCVE369 标准样; E(雌)、F(雄): 亲本性腺组织样本; G-K: 子代鳊鱼(体长 3cm)样本。

表 1 发病鱼塘水体因子鳊鱼病毒检测结果

Tab.1 The results of test SCV among the factors of diseased pond

样本	鳊鱼	食蚊鱼	浮游生物	池塘水	底泥	箭蜓	丝蝇	红娘华	负子虫	龙虱幼虫
编号	H	F	G	E	I	C	D	J	K	L
结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

暴发性传染病初起时, 作者在现场调查时发现, 某一鳊鱼塘发病换水后, 与其共用同一河涌水的其他鳊鱼塘, 有由近及远呈辐射状先后发病的现象, 也说明该病的传染与水环境中的某些因子有较密切关系, 有水平传染的可能。

本研究采用 PCR 技术, 试验中样品几经挑选和漂洗, 尽可能减少外来污染, 在表型健康的鳊亲鱼精巢和卵巢中均检测到鳊鱼病毒, 在其表型健康的子代的内脏中病毒检测亦显阳性, 经过几年数次重复试验, 研究结果一致。这些结果显示, 鳊鱼病毒可以潜伏的形式存在于鳊体内, 并极有可能通过垂直传染的方式进行传播。现场调查的一些证据也支持这一结论。如在该病刚开始流行的 1994 年, 来自同一孵化场的鳊鱼苗在相隔较远的不同地方养殖, 两地养殖的鳊几乎同时发生暴发性传染病, 而其附近的鳊鱼塘暂未发生类似的疾病。这样的例子在调查中多次记录到, 当时推测苗种在孵化场已带有病毒, 且极有可能通过亲鱼传染下来。几年来, 调查和实验结果显示, 广东地区的健康鳊普遍携带病毒, 发病季节在 7 月 - 10 月, 气候突变和气温升高是诱发疾病大规模流行的主要因素^[10]; 即使在采用半封闭式养殖模式的池塘(即在养殖期间不排换水), 仍有不少在流行季节一样发生病毒性病害。2000 年浙江某地从广东引进一批鳊鱼苗, 养殖至 7 月份, 该批鳊在非疫区浙江地区出现类似的病毒病症状, 常用药物处理无效, 死亡率达 50% 以上。诸如此类的现象都支持鳊鱼病毒可垂直传播的论点。

本试验在发病鳊鱼塘中采集的饵料鱼、水生昆虫、浮游生物、底泥及水样中针对病毒的检测结果为阴性, 并不完全排除鳊鱼病毒水平传播的可能性。由于池塘是一个多元复合系统, 本试验目前仅对系统中部分因子进行了分析, 同时由于所取样品有一定局限性, 仍存在某些媒介物带毒、传毒的可能性。因此, 鳊鱼病毒的传播途径以及以何种因子为媒介物进行传染, 尚待更进一步研究。

参考文献

- [1] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊鱼暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 56 - 60.
- [2] 李新辉, 吴淑勤, 潘厚军, 等. 一种快速分离检测鳊鱼病毒的方法[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 112 - 114.
- [3] 何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊鱼暴发性传染病病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998(5): 25 - 31.
- [4] 曾 慷, 何建国, 翁少萍, 等. 传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染途径、宿主范围及对温度敏感性研究[J]. 中国病毒学, 1999, 14(4): 353 - 357.
- [5] 张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到 3 种病毒[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192 - 195.
- [6] 方 勤, 艾桃山, 邹桂平, 等. 鳊鱼病毒病原及细胞感染特性的研究[J]. 中国病毒学, 15(3): 297 - 301.
- [7] 李新辉, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 鳊鱼病毒核酸初步分析[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 165 - 169.
- [8] 李新辉, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 鳊鱼病毒 PCR 诊断方法的建立[J]. 水产学报, 2000, 25(1): 43 - 46.
- [9] 林万明, 杨瑞馥, 黄尚志, 等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995. 8 - 147.
- [10] 赖子尼, 吴淑勤, 石存斌, 等. 气候突变影响藻相水色及其与鳊鱼疾病发生的关系研究[J]. 华南师范大学学报, 1998, (增刊): 64 - 69.

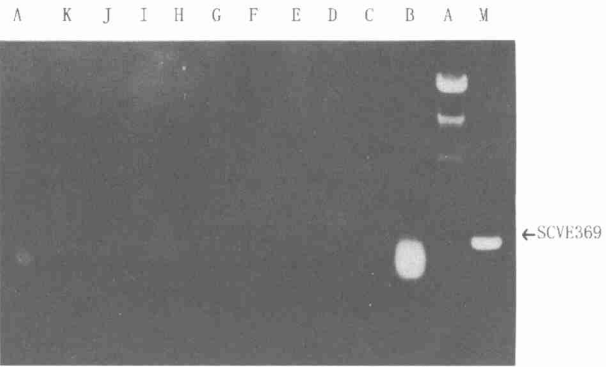


图 3 发病鳊鱼塘水生态相关因子样本 PCR 检测结果
Fig.3 Detection of SCV in some factors relating diseased pond using P1/P2 primer

注: A 为 λ DNA /HingIII; B 为发病鱼; C、D、J、K、L 为水生昆虫; E 为浓缩水样; F 为食蚊鱼; G 为浮游生物混合物; H 为鳊鱼; I 为底泥; M 为 SCVE369 标准样。